

10/506976

08 SEP 2004

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Hiroyuki KUMAGAI, et al.

Attn: Applications

Serial No.: To be assigned - U.S. National Stage Application
based on International Application PCT/JP03/02634
filed March 6, 2003

Filed: September 8, 2004

For: ANGIOGENESIS INHIBITORS

CONFIRMATION CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

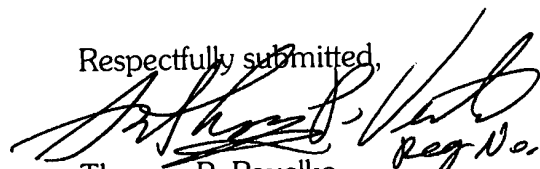
The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified application and the priority provided in 35 USC 119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 2002-63059, filed March 8, 2002.

A copy of the priority document was filed in the International Stage (PCT).

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 USC 119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document.

Respectfully submitted,


for Thomas P. Pavelko
Registration No. 31,674

TPP/mat
Attorney Docket No.: TPP 31745

STEVENS, DAVIS, MILLER & MOSHER, L.L.P.
1615 L Street, N.W., Suite 850
Washington, D.C. 20036
Telephone: (202) 785-0100
Facsimile: (202) 408-5200 or (202) 408-5088

Date: September 8, 2004

14.05.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 3月 8日

REC'D 06 JUN 2003

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-063059

WIPO PCT

[ST.10/C]:

[JP 2002-063059]

出 願 人
Applicant(s):

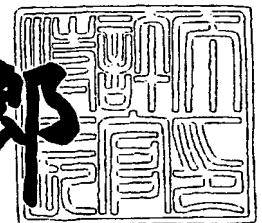
メルシャン株式会社
財団法人微生物化学研究会

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月18日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3027983

【書類名】 特許願

【整理番号】 H13-0891

【提出日】 平成14年 3月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県茅ヶ崎市浜須賀 11-5

【氏名】 熊谷 博行

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県藤沢市藤沢 1-3-7-501

【氏名】 鯨島 朋宏

【発明者】

【住所又は居所】 東京都狛江市岩戸南 3-23-5

【氏名】 松藤 素子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県大和市中央林間 6-2-1-207

【氏名】 河村 直人

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県さいたま市東新井 710-50、16-201

【氏名】 染野 哲也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区田園調布本町 3-17

【氏名】 石塚 雅章

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区東五反田 5-1-11-701

【氏名】 竹内 富雄

【特許出願人】

【識別番号】 000001915

【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

【氏名又は名称】 メルシャン株式会社

【代表者】 鈴木 忠雄

【電話番号】 03(3231)3853

【特許出願人】

【識別番号】 000173913

【氏名又は名称】 財団法人 微生物化学研究会

【代表者】 竹内 富雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053604

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

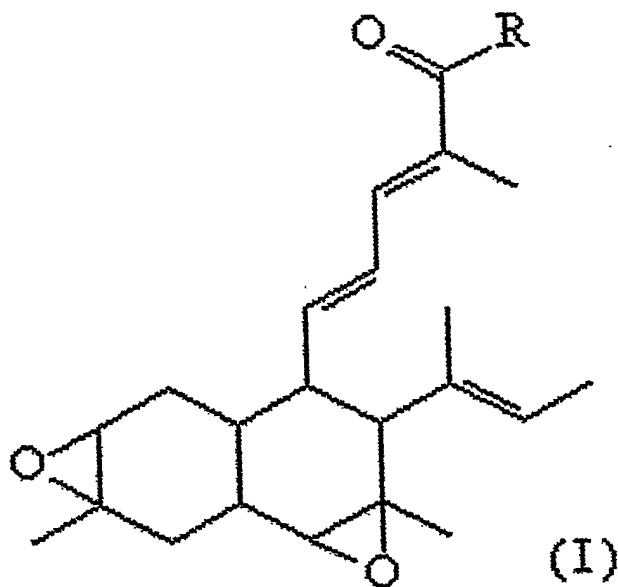
【書類名】 明細書

【発明の名称】 血管新生阻害物質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式(I)で示される化合物。

【化 1】



(但し、式中、Rはメチル基またはエチル基を表わす)

【請求項 2】 アスペルギルス(Aspergillus)属に属し、請求項 1 記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培養して、培養物から請求項 1 記載の化合物を採取することを特徴とする請求項 1 記載の化合物を製造する方法。

【請求項 3】 請求項 1 記載の化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・エスピー(Aspergillus sp.)F-1491株(FERM P-18549)。

【請求項 4】 請求項 1 記載の化合物を有効成分とする血管新生阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アスペルギルス(Aspergillus)属に属する微生物が生産し血管新生を阻害する化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】

血管新生とは、一般的に、プロテアーゼによる血管の基底膜の消化・破壊、血管内皮細胞の遊走・増殖・細胞外マトリックスへの接着および血管内皮細胞の分化による管腔形成、そして血管の再構成を伴う現象である。血管新生は生理的には黄体形成や胎盤形成に際して出現するものであるが、固形がん、糖尿病性網膜症、慢性炎症性疾患などの病態においても出現する。例えば、網膜症においては、先ず既存の網膜血管周囲の基底膜および硝子体までのあいだに介在する網膜組織が破壊され、次いで既存の血管を構成する血管内皮細胞が網膜組織の破壊部位の隙間から遊走し、遊走した血管内皮細胞の隙間を埋めるように血管内皮細胞が増殖した後、網膜硝子体へ遊走した血管内皮細胞が血管を再構成することにより血管新生が進展する。また、固形がんが増殖するには、血管新生によって栄養や酸素の供給と老廃物の除去の道を確保する事が必須である。さらに、現在のがん治療上の大きな問題である転移において、その道を確保するという意味で血管新生が重要なステップとなっている。

【0003】

血管新生は上述したとおり種々の疾患の発症あるいは進行過程に深く関わっていることから、これらの疾患の予防または治療に向けて、血管新生を阻害する物質を模索すべく鋭意研究が活発に推進されている。例えば、血管新生阻害剤としては、血管内皮細胞の増殖阻害作用を有する微生物代謝産物フマギリン類縁体、コラゲナーゼ活性を阻害する作用を有するテトラサイクリン系抗生物質、ヘパリン結合性血管新生因子の受容体への結合抑制作用を有する微生物由来D-グルコ-ガラクトン硫酸等の薬剤が知られている。現在ではいくつかの物質の臨床上での有効性が検討されている。

【0004】

しかしながら、現在、血管新生阻害剤として臨床的に未だ満足できる薬剤がないため、血管新生に係わる上記疾患には十分な治療方法がない。特に糖尿病性網膜症においては、外科的治療法を施行しない限り新生血管の退縮は見られず、その新生血管からの出血による視力障害が問題となっていることから、血管新生に対して優れた効果を示す薬剤の開発が大いに切望されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、血管新生阻害活性を有する新規な化合物、それらの製造方法、それらの化合物を生産する能力を有する新規な微生物およびそれらの化合物を有効成分とする血管新生阻害剤を提供するものである。

【0006】

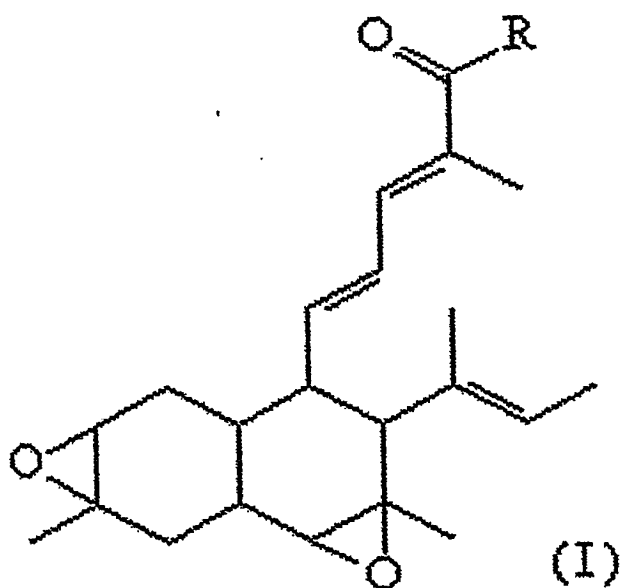
【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため、各地の土壌から微生物を分離し、それらが生産する代謝産物について研究を重ねた結果、新たに分離したアスペルギルス(*Aspergillus*)属に属する微生物が、血管新生の阻害活性を示す物質を培養液中に生産していることを見出した。その培養液から有効物質を分離精製し、その物理化学的性質を調べたところ、得られた有効物質は、いかなる既知物質とも相違し、かつ優れた血管新生阻害活性を有することを見出し、本発明を完成した。

【0007】

本発明は、血管新生阻害活性を示す下記一般式(I)で示される化合物を提供するものである。

【化2】



(但し、式中、Rはメチル基またはエチル基を表わす)

【0008】

本発明者らは、一般式(I)で示される化合物のうち、Rがメチル基である化合物をF-1491B、Rがエチル基である化合物をF-1491Aと命名した。以後、本明細書においてこれらの化合物は上記名称を用いて説明する。

【0009】

なお、F-1491AおよびF-1491Bは、弱い抗真菌活性を有するとして報告されたFusarielin類と構造上の類似性を有している(J.Antibiotics 48(1),45~52(1995))。しかしながら、本発明のF-1491AおよびF-1491Bは、その分子式、物理化学的性質、構造上および生物学的作用の特徴によって既知のFusarielin類とは明確に区別される新規物質である。

【0010】

さらに本発明は、アスペルギルス(Aspergillus)属に属し、血管新生阻害活性を示す一般式(I)で示される化合物を生産する能力を有する微生物を培養し、培養物から該化合物を採取する該化合物の製造方法、該化合物を生産する能力をもつアスペルギルス(Aspergillus)属に属する微生物並びに該化合物を有効成分とする血管新生阻害剤を提供するものである。

【0011】

本発明に使用される微生物は、アスペルギルス(Aspergillus)属に属し、本発明のF-1491AまたはF-1491Bを生産する能力を有する菌株であれば、どのようなものでも使用できる。そのような微生物の探索は、例えば以下のようにして行なうことができる。血管内皮細胞が増殖したマイクロプレート上に、種々の微生物培養液の抽出液を加え、増殖の指標である放射性同位体で標識されたチミジン等の細胞内への取り込みを測定する。この取り込み量の減少、すなわち血管内皮細胞の増殖が阻害された微生物の培養液から活性物質を単離、確認することにより、目的のF-1491AおよびF-1491B物質を生産する能力をもつ微生物を得ることができる。

【0012】

そのようにして見出された微生物として、例えば、本発明者らが土壌から分離

したアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属するF-1491株を挙げることができるが、この菌株に限らず、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、本発明のF-1491AまたはF-1491B物質を生産する能力を有する菌株であれば、それらの変異株、例えば、紫外線、エックス線、放射線、薬品等の変異処理により取得できる人工変異株ならびに自然変異株も含めて、すべて本発明に使用することができる。

【0013】

以下、F-1491株の菌学的性状を説明する。

本菌株をツアペック・イーストエキス・アガー (Czapek Yeast Extract Agar : 以下CYAと記す)、モルトエキス・アガー (Malt Extract Agar : 以下MEAと記す)、20%シュクロース含有ツアペック・イーストエキス・アガー (Czapek Yeast Extract Agar with 20% Sucrose : 以下CY20Sと記す) に接種し、25℃で7日間培養した結果、全ての寒天プレート上において平坦からやや隆起した生育を示し、菌糸は密生した綿毛状からフェルト状でwhite~reddish gray(8A-B1-2)を呈する。裏面は表面とほぼ同様の色調を呈する。分生子形成による表面色調の変化はMEAおよびCY20Sプレートにおいてgrayish green(25C-D5-6)の呈色が認められる。生育速度は培地により異なり、25℃、1週間の培養条件下でCYAプレートでは直径56~58mm、MEAプレートでは24~26mm、CY20Sプレートでは28~29mmに達する。CYAプレートでは、37℃で12~14mmの生育を示す。長期間培養後のCYAプレートにおいては若干透明な滲出液(exudate)の産生が認められる。全てのプレートにおいて可溶性色素の産生は認められなかった。なお、色調に関する記述は「メチューン・ハンドブック・オブ・カラー [Methuen Handbook of Colour (Kornerup & Wanscher, 1978)]」に従った。

【0014】

形態的特徴として、光学顕微鏡による観察でアスペルジラム(*aspergillum*)様の分生子形成構造が確認され、単列性(uniseriate)の構造を成す。分生子形成細胞はフィアロ型、アンブル形で短い首を有する。柄(stipe)は隔壁を持たず無色で平滑(smooth)で、極端に短く40~80×2.5~3.0μmのものが数多く観察される。柄と栄養菌糸との結合部では柄足細胞(foot cell)の存在も確認される。柄の先端より頂囊(vesicle)を生じ、亜球形からフラスコ形で幅は10~15μmのものが

大半であった。メトレは全く観察されない。フィアライドは頂囊の先端から半分までのところより生じ、上方へ向かって生育し、アンプル形で平滑である。大きさは $6.0\sim 7.5\times 1.8\sim 2.5\mu\text{m}$ である。分生子は1細胞性でほぼ全てのものが球形を示し、表面は平滑である。大きさは $2.5\sim 3.5\mu\text{m}$ で、分生子同士は形成時において鎖状に連なるが、明瞭な接続部は認められない。培養開始後4週間以上経過した検体からも閉子囊殻(cleistothecium)等の有性生殖器官の形成は確認されなかった。

【0015】

以上の菌学的性質から、本発明者らは本菌株をアスペルギルス(*Aspergillus*)属に属すると判断し、本菌株をアスペルギルス・エスピー(*Aspergillus* sp.)F-1491と命名し平成13年10月2日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18549の受託番号で寄託した。

【0016】

本発明のF-1491AおよびF-1491B物質は上記菌株を栄養源含有培地に接種し、好氣的に培養することにより製造される。F-1491AおよびF-1491B物質の生産菌としては、アスペルギルス属に属し、F-1491AおよびF-1491B物質を生産する能力を有するものであれば、上記菌株に限らず全て本発明に利用できる。

【0017】

上記微生物の培養方法は、原則的には一般微生物の培養方法に準ずるが、通常は液体培養による振盪培養、通気攪拌培養等の好氣的条件下で実施するのが好ましい。培養に用いられる培地としては、アスペルギルス属に属する微生物が利用できる栄養源を含有する培地であればよく、各種の合成、半合成培地、天然培地などいずれも利用可能である。培地組成として、炭素源としてのグルコース、シユークロース、フルクトース、グリセリン、デキストリン、澱粉、糖蜜等を単独または組み合わせて用いることができる。窒素源としてはファーマメディア、ペプトン、肉エキス、大豆粉、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス、尿素等の有機窒素源を単独または組み合わせて用いることができる。その他、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化コバルト等の塩類、重金属塩、ビタミンBおよびビオチン

等のビタミン類も必要に応じ、添加使用することができる。

【0018】

なお、培養中発泡が著しい場合には、各種消泡剤を適宜培地中に添加することもできる。消泡剤の添加にあたっては、目的物質の生産に悪影響を与えない濃度とする必要がある。培地のpHは5～9程度、通常中性付近とするのが望ましい。培養温度は、通常10～40℃、好ましくは20～27℃に保つのがよい。培養日数は2～14日程度で、通常3～5日である。上述した各種の培養条件は、使用微生物の種類や特性、外部条件等に応じて適宜変更でき、最適条件を選択できるのはいうまでもない。培養液中に蓄積された本発明のF-1491AおよびF-1491B物質は濾過、遠心分離等の既知の通常の固液分離手段によって菌体を分離し、その上清および菌体からの各々抽出により回収可能である。

【0019】

F-1491AおよびF-1491B物質の分離、精製は、公知の種々の方法を選択、組み合わせを行なうことができる。例えば、酢酸エチル、メタノール、n-ブタノール等を用いた溶媒抽出や、アンバーライトXAD(ローム・アンド・ハース社製)、ダイヤイオンHP-20(三菱化学社製)等のポリスチレン系吸着樹脂、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの担体を用いるカラムクロマトグラフィーによる方法を用いることができる。これらの担体から目的物質を溶出させる方法は、担体の種類、性質によって異なるが、一例として、ポリスチレン系吸着樹脂の場合には、溶出溶媒として、含水アルコール、含水アセトン等を用いることができる。さらにセファデックス(Sephadex)LH-20(ファルマシア社製)、バイオ・ゲルP-2(バイオ・ラッド社製)等によるゲル濾過、シリカゲル、アルミナ等による薄層クロマトグラフィー、順相あるいは逆相カラムを用いた分取用高速液体クロマトグラフィー(分取HPLC)等を用いることができ、これらの方法を単独または適宜組み合わせて、場合によっては反復使用することにより、分離、精製することができる。

【0020】

以上のようにして得られるF-1491AおよびF-1491B物質は以下に示す物理化学的性質を有する。

【0021】

1. F-1491A物質の物理化学的性質

(1)形状：白色粉状

(2)分子式： $C_{24}H_{34}O_3$ (高分解能FABマススペクトロメトリーによる $C_{24}H_{35}O_3$ の計算値 m/z :371.2586(M+H)⁺ 実測値 m/z :371.2580)(3)比旋光度： $[\alpha]_D^{26} -194^\circ$ (c 0.1、メタノール)

(4)融点：55～58℃

【0022】

(5)赤外部吸収スペクトル：KBr法で測定した結果は、図1のとおりである。また特徴的な吸収は次のとおりである。

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2970、2915、1660、1630、1440、1375、1260、835

(6)紫外部吸収スペクトル：メタノール中で測定した結果は、図2のとおりである。また特徴的な吸収は次のとおりである。

UV λ_{\max} nm : 280

(7)溶解性：メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシドに可溶、水に難溶。

【0023】

(8)¹H-NMRスペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した結果は図3のとおりである。また各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結合定数は次のとおりである。

δ 7.09(1H, d, J=11.0Hz), 6.45(1H, dd, J=15.0, 11.0Hz), 5.77(1H, dd, J=15.0, 10.0Hz),
 5.29(1H, q, J=7.0Hz), 2.95(1H, d, J=5.6Hz), 2.78(1H, s), 2.73(2H, q, J=7.3Hz), 2.
 57(1H, d, J=5.0Hz), 2.29(1H, ddd, J=11.0, 10.0, 5.0Hz), 2.15(1H, dd, J=13.0, 3.0Hz),
 1.85(3H, s), 1.82(1H, ddd, J=15.0, 5.6, 5.5Hz), 1.70(1H, dd, J=13.0, 12.5Hz), 1.69
 (3H, s), 1.66(3H, d, J=7.0Hz), 1.64(1H, ddd, J=13.0, 12.5, 3.0Hz), 1.38(1H, m), 1.33
 (3H, s), 1.21(3H, s), 1.13(1H, dd, J=15.0, 12.0Hz), 1.07(3H, t, J=7.3Hz)

【0024】

¹³C-NMRスペクトル：重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した結果は図4のとおりである。また各シグナルの化学シフト、多重度

は次のとおりである。

δ 205.2(s), 146.5(d), 139.9(d), 135.3(s), 134.2(s), 128.6(d), 126.9(d), 64.5(d), 62.5(s), 61.3(d), 60.2(s), 54.8(d), 45.4(d), 36.8(t), 35.2(d), 34.3(d), 31.6(t), 30.8(t), 23.1(q), 22.1(q), 19.5(q), 13.6(q), 11.7(q), 9.2(q)

【0025】

2. F-1491B物質の物理化学的性質

(1)形状:白色粉状

(2)分子式: $C_{23}H_{32}O_3$

(高分解能FABマススペクトロメトリーによる $C_{23}H_{32}O_3$ の計算値 m/z : 357.2430(M+H)⁺ 実測値 m/z : 357.2463)

(3)比旋光度: $[\alpha]_D^{26}$ -222° (c 0.1、メタノール)

(4)融点:53~56°C

【0026】

(5)赤外部吸収スペクトル:KBr法で測定した結果は、図5のとおりである。また特徴的な吸収は次のとおりである。

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2965, 2925, 1655, 1630, 1435, 1375, 1255, 835

(6)紫外部吸収スペクトル:メタノール中で測定した結果は、図6のとおりである。また特徴的な吸収は次のとおりである。

UV λ_{\max} nm: 280

(7)溶解性:メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシドに可溶、水に難溶

【0027】

(8)¹H-NMRスペクトル:重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した結果は図7のとおりである。また各シグナルの化学シフト、多重度、スピン結合定数は次のとおりである。

δ 7.12(1H, d, J=11.0Hz), 6.46(1H, dd, J=15.0, 11.0Hz), 5.80(1H, dd, J=15.0, 10.3Hz), 5.30(1H, q, J=7.0Hz), 2.98(1H, d, J=5.6Hz), 2.79(1H, s), 2.58(1H, d, J=5.1Hz), 2.31(3H, s), 2.30(1H, ddd, J=10.7, 10.3, 5.1Hz), 2.15(1H, dd, J=12.9, 2.5Hz), 1.84(3H, s), 1.82(1H, ddd, J=15.0, 5.6, 5.5Hz), 1.70(1H, dd, J=12.9, 12.2Hz), 1.70(3H, s), 1

.67(3H,d,J=7.0Hz),1.64(1H,ddd,J=13.0,12.2,2.5Hz),1.40(1H,m),1.34(3H,s),1.22(3H,s),1.13(1H,dd,J=15.0,12.2Hz)

【 0 0 2 8 】

(9)¹³C-NMRスペクトル:重メタノールに溶解し、内部標準にテトラメチルシランを用いて測定した結果は図8のとおりである。また各シグナルの化学シフト、多重度は次のとおりである。

δ 202.4(s),146.7(d),141.1(d),136.0(s),134.1(s),128.6(d),127.0(d),64.5(d),62.5(s),61.4(d),60.1(s),54.6(d),45.4(d),36.9(t),35.3(d),34.1(d),31.6(t),25.6(q),23.0(q),22.1(q),19.5(q),13.6(q),11.5(q)

【 0 0 2 9 】

本発明のF-1491AおよびF-1491B物質は、優れた血管新生阻害活性を有しており、しかも、細胞に対する毒性が低いので血管新生の亢進に随伴する疾患、例えば固形がん細胞の増殖、糖尿病性網膜症、乾癬などの治療薬としての使用が期待される。

【 0 0 3 0 】

本発明の化合物の血管新生阻害活性は、例えば、ヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖抑制という指標で以下に述べる方法により測定することができる。コラーゲンコートした96穴マイクロプレート(住友ベークライト社)に10μg/lの塩基性繊維芽細胞増殖因子および10%子牛血清を含むMCDB131培地(クロレラ工業社)で2×10³個/ウェルに調製したヒト臍帯静脈内皮細胞(セルシステムズ社)0.1mlを撒くと同時に試験試料を適量添加する。37℃、5%CO₂を含む空気下で48時間培養し、さらに1μCi/ウェルの³H-チミジンを加えて8時間培養する。次いで細胞をセルハーベスターを用いて集め、細胞に取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンタを用いて測定する。

【 0 0 3 1 】

試験試料中に血管内皮細胞の増殖抑制に有効な物質が含まれる場合、細胞内に取り込まれる放射活性は抑制される。また試験試料の濃度に対する前記細胞の放射活性の変化により、この試験試料の有効な濃度域が求められる。

【 0 0 3 2 】

本発明のF-1491AおよびF-1491B物質は下記表1に示すとおり、低濃度でヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖を抑制した。

【0033】

【表1】

表1 F-1491A物質、F-1491B物質のヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖阻害活性

化合物	50%阻害濃度(mg/L)
F-1491A	2.2
F-1491B	3.4

【0034】

また、本発明のF-1491AおよびF-1491B物質は下記表2に示すとおり各種培養細胞に対してほとんど毒性を示さない。

【0035】

【表2】

表2 F-1491A物質、F-1491B物質のヒトがん細胞の増殖阻害活性

細胞	50%増殖阻害濃度(mg/L)	
	F-1491A	F-1491B
K562	39	36
H226	>100	>100
DLD-1	>100	>100
HT1080	>100	>100

【0036】

なお、試験は、以下のとおり行なった。各種ヒトがん細胞(K562(白血病)、H226(肺がん)、DLD-1(前立腺がん)、HT1080(線維肉腫))を10%子牛血清を含むRPMI1640培地またはDMEM培地を用いて、それぞれ 5×10^3 個/ウェルとなるように調製し、96穴マイクロプレートに0.1ml撒いた。同時に適当量のF-1491A物質またはF-1491B物質を添加し、37℃、5%CO₂を含む空気下で72時間培養した。さらに0.5%のMTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5-biphenyl tetrazolium bromide)を10 μ l

加え4時間培養した。培養後、0.1mlの10%SDS-0.01N塩酸を加え、570nmの吸光度を測定し、50%増殖阻害濃度を求めた。

【0037】

以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例】

実施例1

アスペルギルス・エスピー(*Aspergillus* sp.)F-1491株(FERM P-18549)株の斜面培地(ポテトデキストロースアガー)から1白金耳を50mlの種母培地(ポテト澱粉2%、グルコース1%、大豆粉(エスサンミート：味の素社製)2%、リン酸二水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.05%、pH無調整)を入れた500ml容の三角フラスコに接種し、25℃で2日間ロータリーシェーカー上で培養して種培養液を得た。生産培地としてグリセリン2%、ペプトン(極東製薬社製)1%、酵母エキス0.5%、乾燥酵母(エビオス：アサヒビール薬品社製)0.5%からなる培地を用い、500ml容の三角フラスコにそれぞれ60mlを入れて殺菌後、種培地を1%ずつ接種した。25℃で4日間ロータリーシェーカー上で培養した後、得られた培養液10Lを遠心分離器にかけ、培養濾液および菌体に分離した。

【0038】

得られた培養濾液を、水で平衡化した2Lの吸着樹脂ダイヤイオン(Diaion)HP-20(三菱化学社製)カラムに通過させた。活性成分が吸着されたHP-20カラムを50%メタノール水5Lで洗浄した後、メタノール3Lで活性成分を溶出した。溶出液より減圧下でメタノールを留去した。

【0039】

一方、菌体はメタノール3Lで抽出後、減圧下でメタノールを留去した。両者を合わせ、酢酸エチル1Lで抽出した。この抽出液を減圧濃縮し、褐色油状物質7.5gを得た。これを少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルムで充填したシリカゲルカラム(500ml)に供した。クロロホルム1Lおよびクロロホルム-メタノール混液(50:1)1Lで溶出した。F-1491A物質およびF-1491B物質を含む画分を集め、減圧濃縮し、黄色油状物質1.2gを得た。

【0040】

これを少量のトルエンに溶解し、トルエンで充填したシリカゲルカラム(200ml)に供した。このカラムをトルエン-アセトン混液(20:1)で洗浄後、トルエン-アセトン混液(10:1)で展開した。F-1491A物質およびF-1491B物質を含む画分を集め、減圧濃縮し、黄色粉状物質200mgを得た。

【0041】

これを少量のメタノールに溶解し、分取用高速液体クロマトグラフ装置により分取した。分離カラムにはInertsil ODS-3(ジエールサイエンス社製)20mm I.D.×250mmを使用し、アセトニトリル-水混液(7:3)を移動層として7ml/minの流速で溶出し、F-1491A物質およびF-1491B物質を含む画分を集めた。それぞれの画分を減圧濃縮し、粗F-1491A物質15mgおよび粗F-1491B物質13mgを得た。さらに、それぞれの画分を少量のメタノールに溶解し、200mlのセファデックスLH-20カラム(ファルマシア社製)に供し、メタノールで溶出した。活性画分を集め、F-1491A物質10mgおよびF-1491B物質7mgを得た。

【0042】

【発明の効果】

F-1491AおよびF-1491B物質は、優れた血管新生阻害活性を有し、また培養細胞に対する毒性が低いので、血管新生の亢進に随伴する疾患への治療薬としての利用が期待できる。

【図面の簡単な説明】

- 【図1】 F-1491A物質のKBr法での赤外部吸収スペクトルである。
- 【図2】 F-1491A物質のメタノール溶液での紫外部吸収スペクトルである。
- 【図3】 F-1491A物質の重メタノール溶液での¹H-NMRスペクトルである。
- 【図4】 F-1491A物質の重メタノール溶液での¹³C-NMRスペクトルである。
- 【図5】 F-1491B物質のKBr法での赤外部吸収スペクトルである。
- 【図6】 F-1491B物質のメタノール溶液での紫外部吸収スペクトルである。
- 【図7】 F-1491B物質の重メタノール溶液での¹H-NMRスペクトルである。
- 【図8】 F-1491B物質の重メタノール溶液での¹³C-NMRスペクトルである。

【書類名】 図面

【図 1】

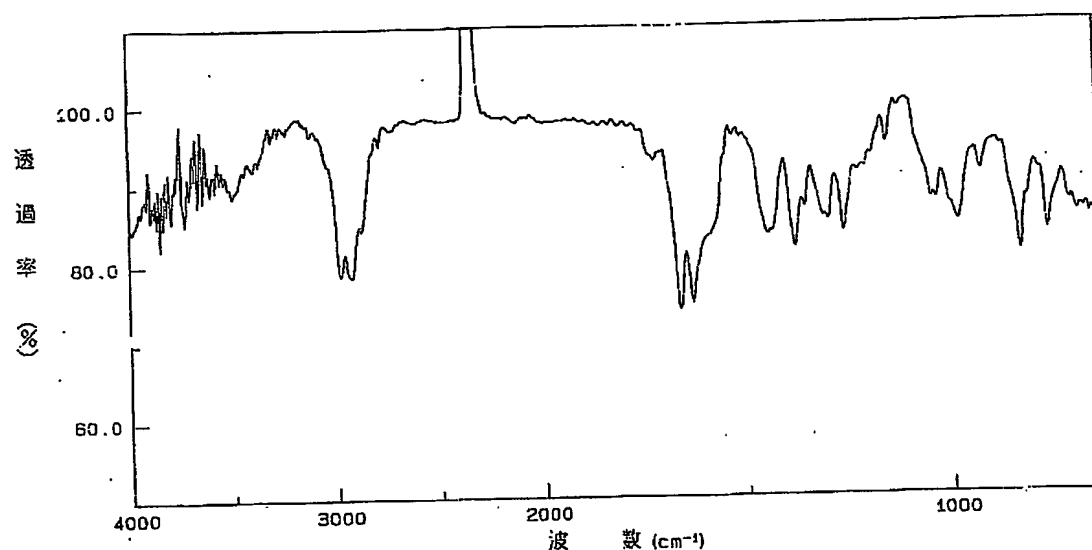


図 1 F-1491A 物質の KBr 法による赤外部吸収スペクトル

【図 2】

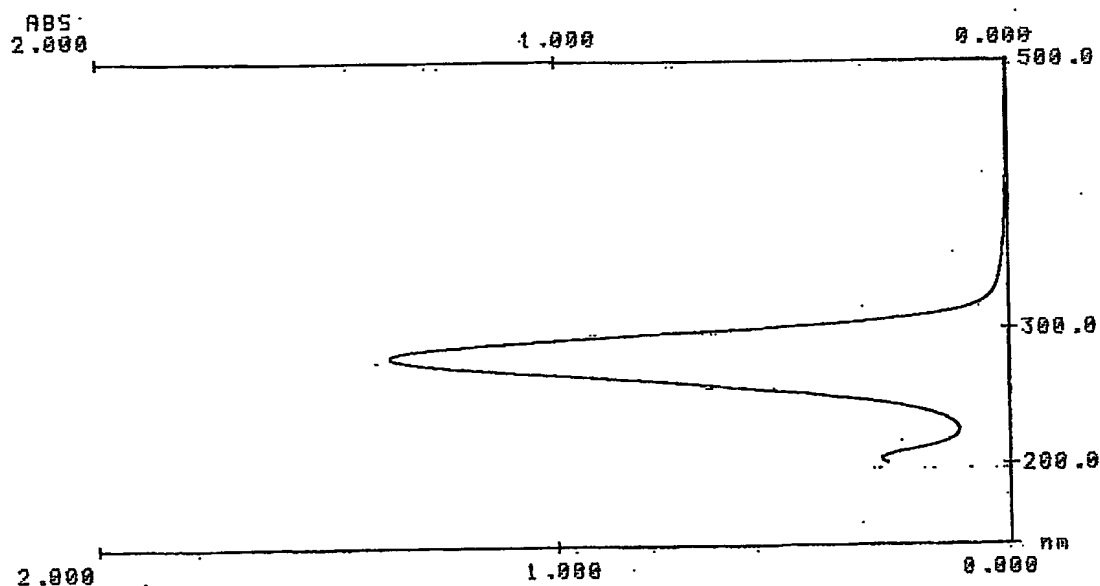


図 2 F-1491A 物質のメタノール溶液中の紫外吸収スペクトル

【図3】

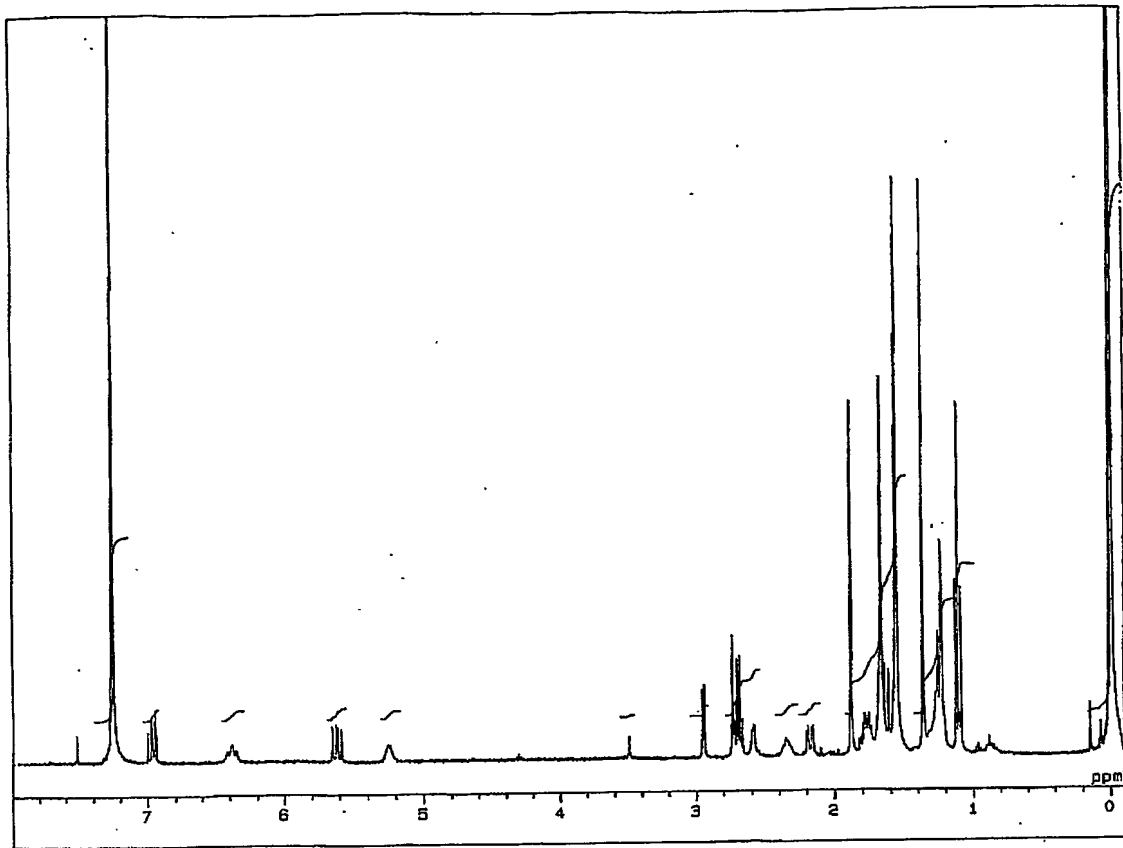


図3. F-1491A 物質の CD_3OD 中における ^1H -NMR スペクトル

【図 4】

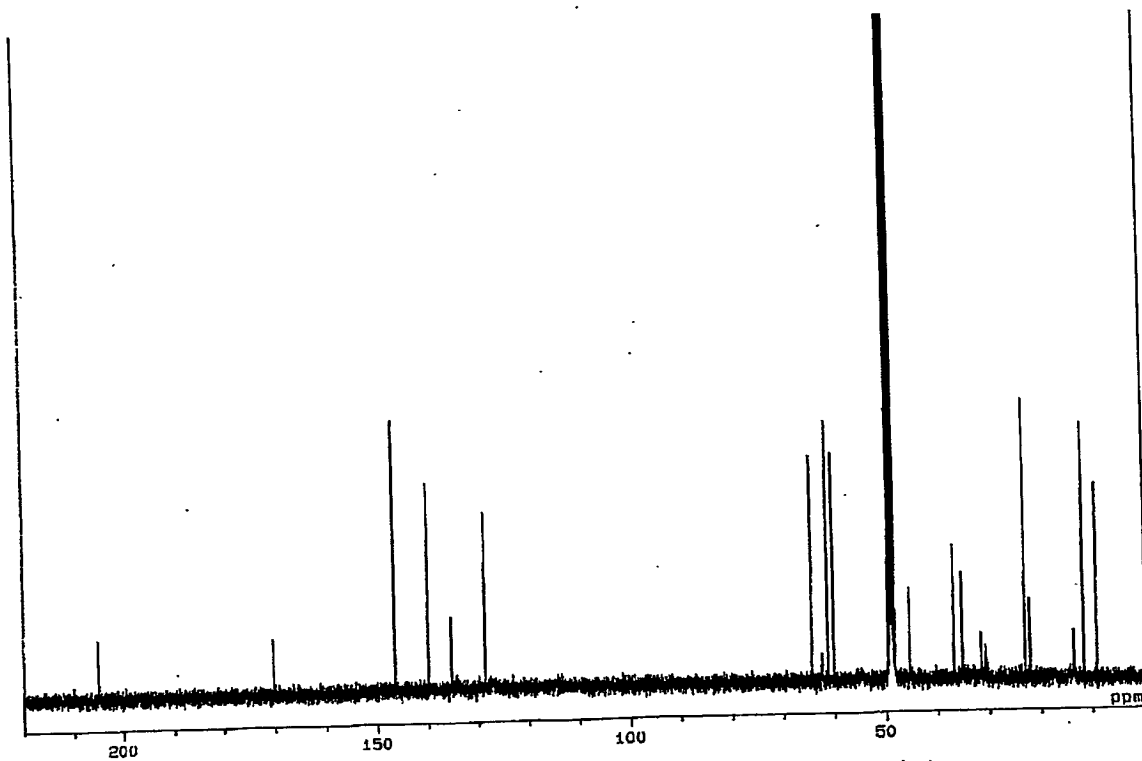


図 4. F-1491A 物質の CD_3OD 中における ^{13}C -NMR スペクトル

【図 5】

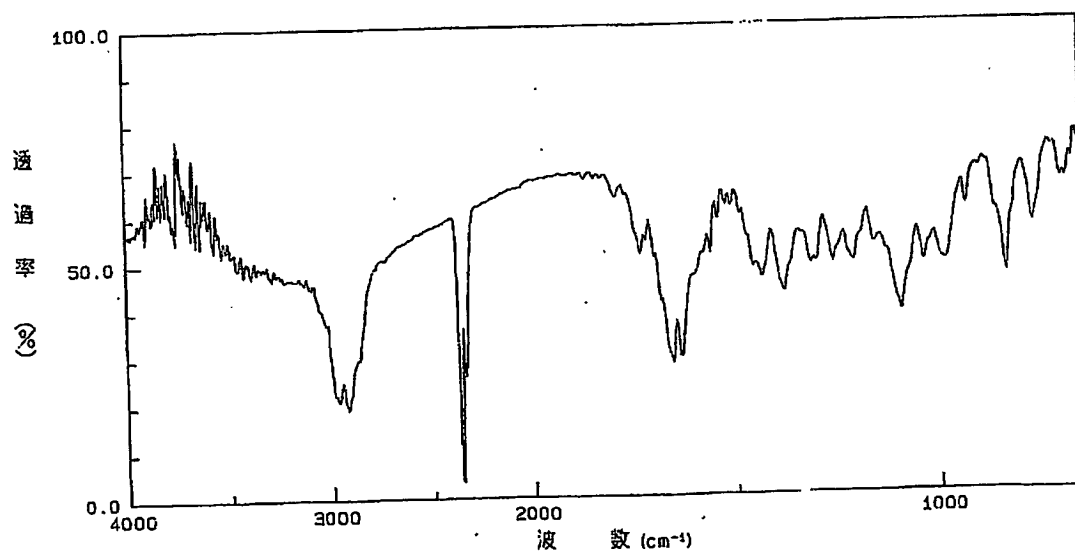


図 5 F-1491B 物質の KBr 法による赤外部吸収スペクトル

【図6】

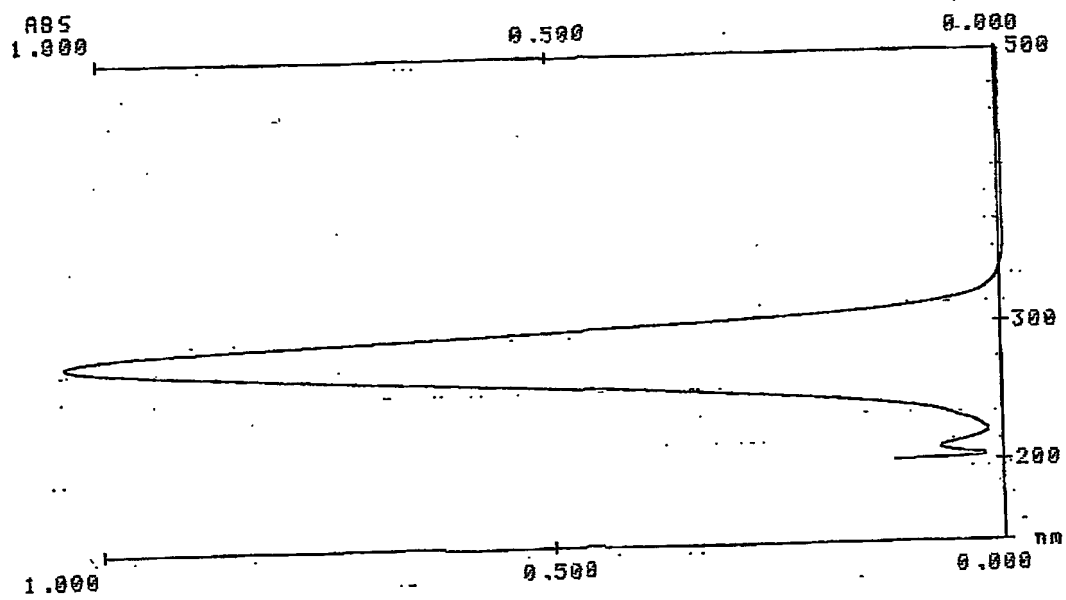


図 6. F-1491B 物質のメタノール溶液中の紫外外部吸収スペクトル

【図 7】

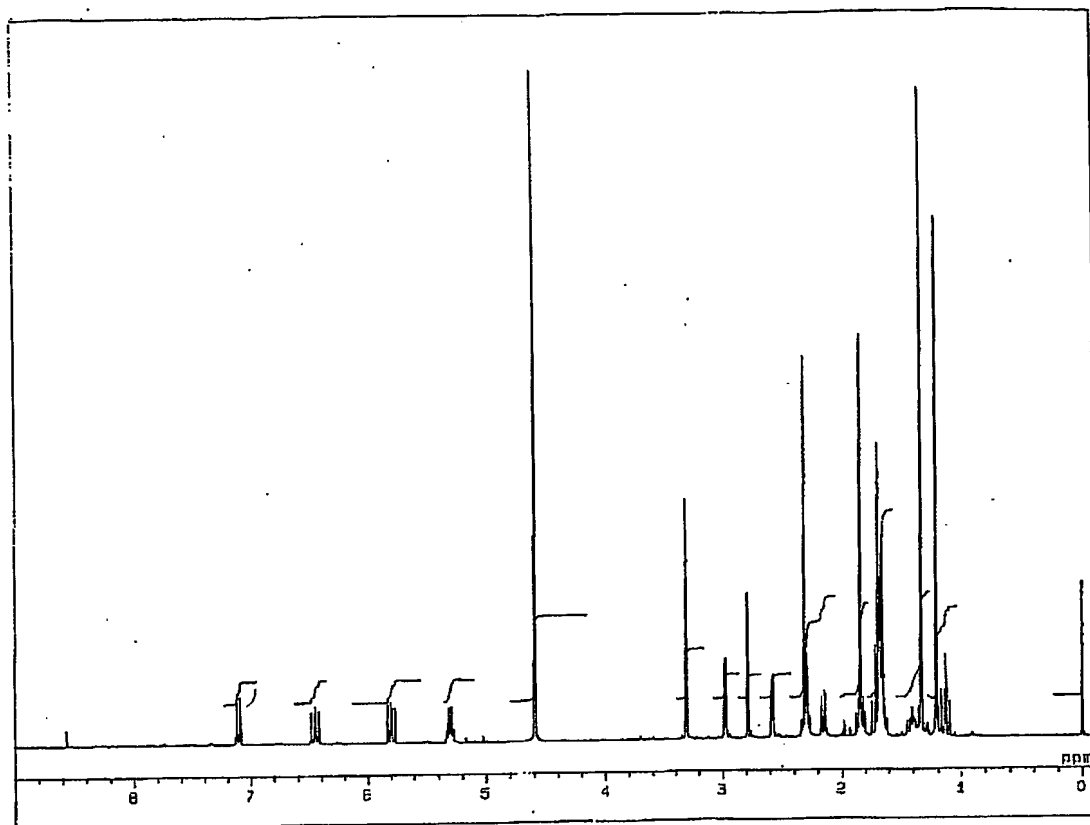


図 7. F-1491B 物質の CD_3OD 中における ^1H -NMR スペクトル

【図 8】

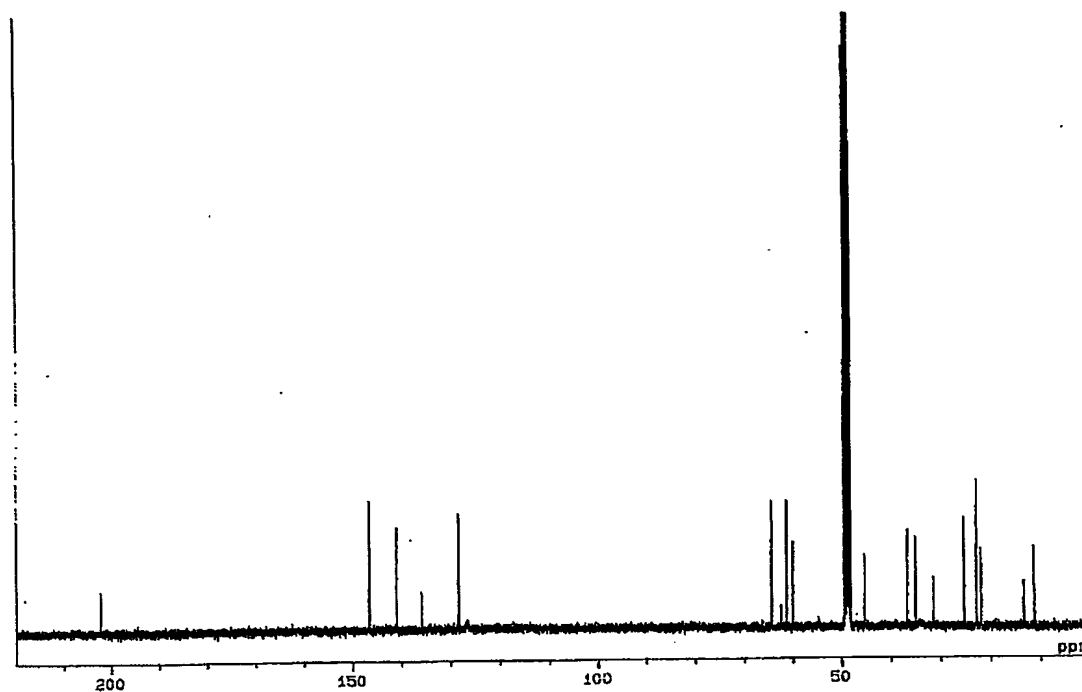


図 8. F-1491B 物質の CD_3OD 中における ^{13}C -NMR スペクトル

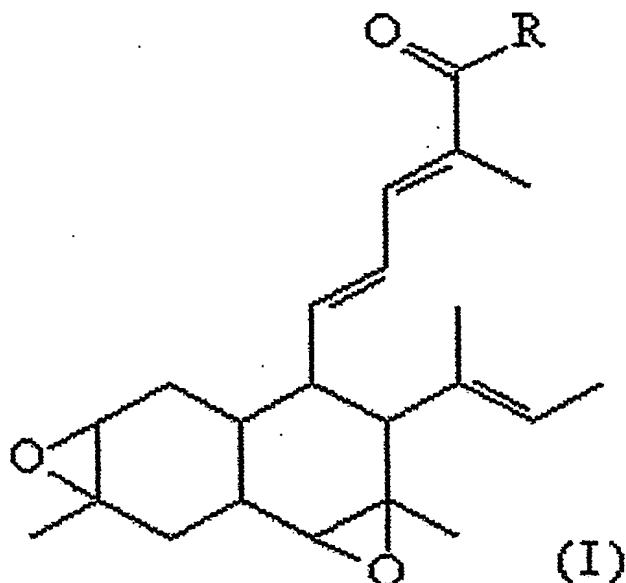
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血管新生阻害活性を有する新規な化合物、それらの製造方法、それらの化合物を生産する能力を有する新規な微生物およびそれらの化合物を有効成分とする血管新生阻害剤の提供。

【解決手段】 下記一般式(I)で示される化合物。

【化1】



(但し、式中、Rはメチル基またはエチル基を表わす)

アスペルギルス(*Aspergillus*)属に属し、上記化合物を生産する能力を有する微生物を培養して、培養物から上記化合物を採取する化合物の製造方法。上記化合物を有効成分とする血管新生阻害剤。上記化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・エスピー(*Aspergillus* sp.)F-1491株(FERM P-18549)。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-063059
受付番号	50200323758
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0093
作成日	平成 14 年 5 月 17 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000001915
【住所又は居所】	東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8 号
【氏名又は名称】	メルシャン株式会社
【特許出願人】	
【識別番号】	000173913
【住所又は居所】	東京都品川区上大崎 3 丁目 14 番 23 号
【氏名又は名称】	財団法人微生物化学研究会

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001915]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区京橋1丁目5番8号

氏 名 メルシャン株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173913]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

氏 名 財団法人微生物化学研究会